

**Magnetic particle for transport of diagnostic or therapeutic agent**

**Patent number:** DE19624426  
**Publication date:** 1998-01-02  
**Inventor:** BERGEMANN CHRISTIAN (DE)  
**Applicant:** BERGEMANN CHRISTIAN (DE)  
**Classification:**  
- **International:** H01F1/09; H01F1/44; A61K47/48; A61K38/49;  
A61K31/71; A61K33/24; A61K31/135; C01G49/06;  
C01G49/08  
- **European:** A61K9/50T; A61K31/135; A61K31/70N10P5;  
A61K33/24; A61K33/26; A61K38/49; A61K47/48W8B;  
A61K49/18; C01G49/06; C01G49/08; H01F1/00E10;  
H01F1/11C; H01F1/44P  
**Application number:** DE19961024426 19960619  
**Priority number(s):** DE19961024426 19960619

**Report a data error here**

**Abstract of DE19624426**

Coated magnetic particles comprise: (a) a core containing nano-crystalline magnetic particles of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , double oxides or hydroxides of divalent or trivalent iron with divalent and/or trivalent metals, oxides or hydroxides, and (b) a coating consisting of a polymer having reactive groups capable of undergoing covalent bonding or ion exchange. Also claimed are aqueous solutions containing these coated magnetic particles.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

Best Available Copy



18 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 196 24 426 A 1

21 Aktenzeichen: 196 24 426.9  
22 Anmeldetag: 19. 6. 96  
43 Offenlegungstag: 2. 1. 98

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
H 01 F 1/09  
H 01 F 1/44  
A 61 K 47/48  
A 61 K 38/49  
A 61 K 31/71  
A 61 K 33/24  
A 61 K 31/135  
// C01G 49/06, 49/08

DE 196 24 426 A 1

71 Anmelder:  
Bergemann, Christian, 10777 Berlin, DE

72 Erfinder:  
Bergemann, Christian, 10777 Berlin, DE

56 Entgegenhaltungen:  
JP 61-1 89 607 A  
JP 63-41 423 A  
JP 22-29 545 A  
JP 61-189607(A) in Patent absta

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Magnetische Flüssigkeiten für den Transport von diagnostisch oder therapeutisch wirksamen Substanzen

57 Die Erfindung betrifft magnetische Partikel aus einem Kern, der nanokristalline magnetische Teilchen aus  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , Doppeloxiden oder -hydroxiden des zwei- oder dreiwertigen Eisens mit zwei- oder dreiwertigen Metallen oder Gemische der genannten Oxide oder Hydroxide enthält, und einer Hülle, die aus einem Polymeren mit reaktiven Gruppen, die zur kovalenten Bindung oder zum Ionenaustausch befähigt sind, besteht. Vorzugsweise ist die Hülle vernetzt und umfaßt weiterhin eine therapeutisch wirksame Substanz. Weiterhin betrifft die Erfindung wäßrige Suspension der magnetischen Partikel, Arzneimittel, die eine solche wäßrige Suspension zusammen mit üblichen Hilfstoffen enthalten, und Verfahren zur Herstellung der nanokristallinen magnetischen Teilchen.

DE 196 24 426 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 10. 97 702 061/128

14/28

## DE 196 24 426 A1

1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft magnetische Partikel sowie die Zusammensetzung, Herstellung und Verwendung von physiologisch verträglichen magnetischen Flüssigkeiten, die aus einer wäßrigen Dispersion der magnetischen Partikel bestehen sowie für den Transport von diagnostisch und therapeutisch wirksamen Substanzen geeignet sind.

Aus Gründen der begrifflichen Klarheit wird in dieser Anmeldung von magnetischen Partikeln gesprochen, wenn diese mit Polymeren umhüllt sind, anderenfalls von magnetischen Teilchen.

Die zielgerichtete Arzneimittellapplikation durch magnetisch steuerbare Trägersysteme zum Erreichen hoher lokaler Wirkstoffkonzentrationen in erkrankten Gebieten bei gleichzeitiger Minimierung systemisch bedingter Nebenwirkungen kann den therapeutischen Nutzen von Pharmaka gegenüber konventionellen Applikationswegen erhöhen. Dies trifft z. B. auf chemotherapeutisch wirksame Medikamente zu, deren applizierbare Dosis durch toxische Nebenwirkungen auf den Gesamtorganismus limitiert ist. Besonders im Bereich der Onkologie wird deshalb versucht, eine regionale, im Tumor erhöhte Konzentration zellschädigender Substanzen aufzubauen.

In der Wissenschafts- und Patentliteratur sind deshalb Systeme beschrieben worden, in denen das Pharmakon mit magnetischen Partikeln in Verbindung gebracht und mit Hilfe externer Magnetfelder regional angereichert werden kann.

Gemäß US 4 247 406 werden magnetische Teilchen und die zu transportierende Pharmaka in einer Matrix von Polyaminosäuren oder denaturiertem Albumin eingeschlossen. Die Aufnahme von Chemotherapeutika und magnetischen Teilchen in Liposomen wird in JP 63014717, JP 61005009 und US 714 711 beschrieben, der Einschuß beider Komponenten in Öl und die anschließende Formulierung als Emulsion beanspruchen die Patentanmeldungen JP 57109714 und JP 56090008. Die Mikroverkapselung von Zytostatika und Ferrofluiden in synthetischen oder natürlichen Polymeren wird in JP 02229545, JP 63041423, JP 58024516 und im J. Pharm. Pharmacol. 35, 59—61, 1983 beschrieben.

In keinem dieser Systeme kommt es zu einer direkten Bindung zwischen dem Pharmakon und den magnetisch beeinflussbaren Partikeln oder Teilchen. Enzymatische oder mechanische Zerstörung der Hülle oder Matrix nach Applikation zieht somit eine frühzeitige Freisetzung beider Komponenten und den Verlust der magnetischen Beeinflussbarkeit des zu transportierenden Pharmakons nach sich.

Auch besteht die Gefahr, durch aggressive oder mit dem Pharmakon inkompatible Chemikalien oder Reaktionsbedingungen, die zur Herstellung arzneimittel- und magnetitbeladener Mikrosphären notwendig sind, eine teilweise oder vollständige Zerstörung oder Inaktivierung der Wirkstoffstruktur zu verursachen.

Herstellungsbedingt weisen die bekannten Partikel oder Teilchen häufig Durchmesser von 1—50 µm auf. Intravenös appliziert sind diese nicht oder nur unzureichend gefäßgängig und können so zu Embolien führen. In Abhängigkeit von der Partikel- oder Teilchengröße werden sie vom phagozytierenden System mehr oder weniger schnell aus dem Blut eliminiert, so daß eine ausreichende magnetische Verfügbarkeit im Zielgebiet nicht gegeben ist.

Deshalb müssen die Partikel oder Teilchen z. B. in-

2

traarteriell injiziert werden, was in der klinischen Praxis zu erheblichen Problemen führt. Bedingt durch die magnetischen Eigenschaften solcher Mikrosphären, insbesondere das ungünstige Verhältnis von magnetischen Materialien zum Gesamtdurchmesser der Partikel, ist es nur unzureichend möglich, mit technisch verfügbaren und handhabbaren magnetischen Feldstärken eine Anreicherung im Zielgebiet zu erreichen.

Ziel der Erfindung ist es deshalb, die beschriebenen Nachteile der bekannten Systeme zu überwinden, um verbesserte oder neue Anwendungsfelder zu eröffnen. Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, wäßrige physiologisch verträgliche magnetische Flüssigkeiten herzustellen, bei denen die Partikeloberflächen diagnostisch oder therapeutisch wirksame Substanzen binden können und die intravenös appliziert eine ausreichende intravasale Verfügbarkeit aufweisen, um durch externe Magnetfelder lokal angereichert werden zu können.

Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß nanokristalline magnetische Teilchen aus  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , Doppeloxid/hydroxiden des zwei- oder dreiwertigen Eisens mit zwei- oder dreiwertigen anderen Metallionen oder Gemische der genannten Oxide oder Hydroxide von einer Hülle aus einem Polymeren umgeben sind, wobei das Polymere reaktive Gruppen aufweist, die zur kovalenten Bindung oder zum Ionenaustausch befähigt sind, insbesondere diagnostische oder therapeutisch wirksame Substanzen ionisch oder kovalent zu binden vermögen. Bevorzugt ist das Polymere an dem Kern aus magnetischen Teilchen chemisorbiert.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform liegen die nanokristallinen magnetischen Teilchen als Eindomänenteilchen vor.

Die kleinen herstellbaren magnetischen Teilchen weisen einen Durchmesser von 3—10 nm auf. Hierbei handelt es sich um sogenannte Eindomänenteilchen; größere Teilchen sind Agglomerate mehrerer Eindomänenteilchen und werden als Mehrdomänenteilchen bezeichnet. Da die bekannten Magnetitzubereitungen (siehe US 5 262 176) hauptsächlich für diagnostische Anwendungen eingesetzt werden, lag dort der Schwerpunkt auf der Synthese sehr kleiner Partikel. Diese eignen sich hinsichtlich ihrer magnetischen Eigenschaften jedoch nicht oder nur unzureichend, durch magnetische Feldgradienten inhärente Widerstände (Scherkräfte, Volumenkräfte, Drücke) im Gefäßsystem zu überwinden und sich im Zielgebiet relevant anzureichern.

Parenteral applizierte partikuläre Systeme werden vom phagozytierenden System aus dem Blut aufgenommen, wobei der zeitliche Ablauf hauptsächlich von der Teilchen- oder Partikelgröße abhängig ist. Daher kann zur Gewährleistung einer freien Verfügbarkeit im Blutpool, die zur Fixierung der Partikel oder Teilchen z. B. in Tumoren notwendig ist, die Partikelgröße nicht auf mikrometergroße Dimension erhöht werden.

Ein weiteres Ziel der Erfindung war es deshalb, magnetische Mehrdomänenteilchen mit einem Durchmesser von 100—1000 nm zu synthetisieren, die durch eine geordnete Struktur und somit hohe Packungsdichte von Eindomänenteilchen gekennzeichnet sind.

Nach dem Stand der Technik (U. Schwertmann u. R. M. Cornell, Iron Oxides in the Laboratory, VCH Weinheim 1991) werden magnetisch kolloidale Eisenhydroxid-Teilchen durch Fällung einer sauren Eisen(II)/Eisen(III)-salzlösung durch Laugen hergestellt. Die Teilchengrößen können durch Syntheseparameter wie Konzentration der Eisensalzlösung, Titrationsgeschwindigkeit der Lauge, Temperatur oder die Zugabe

DE 196 24 426 A1

3

von Polymeren gesteuert werden.

Überraschend wurde gefunden, daß sich nanokristalline magnetische Teilchen aus  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  oder entsprechenden Hydroxiden durch die Überführung einer sauren Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-salzlösung in Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-carbonat mittels Zugabe einer äquivalenten Menge von Alkalicarbonaten wie Natriumhydrogencarbonat, Natriumcarbonat oder Ammoniumcarbonat und die anschließende thermische Oxidation zu magnetischem Eisenhydroxid und weiter zu magnetischem Eisenoxid herstellen lassen.

Die Größe der Teilchen läßt sich durch die thermische Reaktionsgeschwindigkeit und Konzentration der Eisensalzlösung steuern. So wurden kleine Durchmesser von 20–100 nm bei zeitlich getrennter Bildung von Eisen(II,III)-carbonat bei Temperaturen von 1–50°C, vorzugsweise 5–10°C, und anschließender Erwärmung, größere Teilchen von 100–1000 nm bei Reaktionstemperaturen von 60–100°C und der damit verbundenen rascheren Überführung von Eisen(II,III)-carbonat zu Eisen(II,III)-hydroxid erreicht.

Die Überführung einer Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-salzlösung in einen Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-Komplex durch Zugabe eines oder mehrerer Komplexbildner wie z. B. Ethylendiamin-tetraessigsäure, Citronensäure, Weinsäure oder deren Salze, die anschließende Neutralisation mit mäßig basischen Reagentien wie Ammoniak oder Alkalicarbonaten und die Ausfällung der Eisenhydroxide durch Zugabe von starken Laugen wie Natronlauge bis auf einen pH-Wert von 11, ergeben ebenfalls gewünschte magnetische Teilchen. Die Titrationsgeschwindigkeit bei der Alkalisierung bestimmt die Größe der magnetischen Teilchen.

Erfindungsgemäß können gewünschte Teilchenkonfigurationen auch durch die Behandlung einer Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-salzlösung mit basischen Anionenaustauscherharzen synthetisiert werden. Diese werden der Eisensalzlösung in einer solchen Geschwindigkeit zugesetzt, daß ein konstanter Anstieg des pH-Wertes auf 7–10 gewährleistet ist. Die dabei entstehenden Teilchengrößen lassen sich durch die Auswahl unterschiedlicher Anionenaustauschertypen steuern. So entstehen bei der Verwendung schwach basischer Anionenaustauscher, wie sie z. B. unter dem Handelsnamen Amberlit IR 45 bekannt sind, kleine Teilchendurchmesser, bei stark basischen wie z. B. Amberlit IRA 420 größere Teilchen.

Bei einem molaren Verhältnis der Eisen(II)/Eisen(III)-salzlösung von 1 : 2 bildet sich bei Alkalisierung das ferrimagnetische  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Magnetit). Dessen milde Oxidation ergibt das ebenfalls ferrimagnetische  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Als Eisensalze können z. B. Eisen(III)-chlorid, Eisen(III)-sulfat, Eisen(III)-nitrat sowie Eisen(II)-chlorid, Eisen(II)-sulfat oder die jeweiligen Doppelsalze wie Eisen(II)/Eisen(III)-ammoniumsulfate eingesetzt werden.

Nanokristalline magnetische Teilchen aus Doppeloxiden oder -hydroxiden des zwei- oder dreiwertigen Eisens mit zwei- oder dreiwertigen Metallen oder Gemischen der genannten Oxide oder Hydroxide können ebenfalls nach den obengenannten Verfahren hergestellt werden, indem eine Lösung von Salzen des zwei- oder dreiwertigen Eisens und zwei- oder dreiwertigen Metallen umgesetzt wird. Magnetische Doppeloxide oder -hydroxide des dreiwertigen Eisens werden dabei bevorzugt mit zweiwertigen Metallionen aus der ersten Reihe der Übergangsmetalle, wie z. B. Co (II), Mn (II), Cu (II) und Ni (II) synthetisiert, die des zweiwertigen Eisens mit dreiwertigen Metallionen wie Cr (III), Gd

4

(III), Dy (III) oder Sm (III).

Die so hergestellten magnetischen Teilchen werden durch Filtration, Ultrafiltration, Dialyse oder magnetische Separation von Fremdionen gereinigt, gegebenenfalls eingeeignet und stehen zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

Da Eisenhydroxide und -oxide gegenüber Elektrolyten kein stabiles und somit injizierbares kolloides Sol ausbilden, müssen diese zur Herstellung galenisch stabiler Zubereitungen mit einem geeigneten hydrophilen Polymer umhüllt werden. Diese Hüllsubstanzen müssen toxikologisch unbedenklich, metabolisch abbaubar, chemisch stabil und hitzesterilisierbar sein. Bei den in der Literatur beschriebenen Hüllsubstanzen handelt es sich überwiegend um natürliche Polymere, besonders häufig wird von dem Polysaccharid Dextran berichtet (US 4 101 435), das in Anwesenheit der Eisen(II)/Eisen(III)-salzlösung bei der Fällung mit Laugen Dextran-Magnetit Cluster ergibt.

Da ein weiteres Ziel der Erfindung nicht nur in der physiologisch zuverlässigen Stabilisierung der magnetischen Partikel liegt, sondern auch in der Bindung von Pharmaka an deren Hülle, mußten geeignete Substanzen hierfür erfindungsgemäß erarbeitet werden. Überraschenderweise ist es gelungen, diese Aufgabe durch wasserlösliche Polysaccharid-, Protein- und synthetische Polymerderivate mit endständigen ionenaustauscheraktiven oder freien chemisch reaktiven Gruppen zur heteropolaren oder kovalenten Bindung von diagnostisch oder therapeutisch wirksamen Substanzen zu lösen.

Erfindungsgemäß können für die heteropolare Bindung ionenaustauscheraktive Stärkeester oder Stärkeäther sowie deren thermische, säurekatalytische oder enzymatische Abbauprodukte wie z. B. Dextrine verwendet werden. Dazu zählen Xanthate und Xanthide, Dicarboxyl-, Carboxymethyl-, Sulfon-, Sulfat-, Triacetat-, Phosphonat-, Phosphat-, Citrat-, Tartrat-, Lactat- und Diethylaminoethylstärke sowie die polymere Arabinsäure. Stärkederivate mit funktionellen Gruppen zur kovalenten Bindung wie z. B. Aldehyd-, Dialdehyd-, Amino-, Diazo-, Carbodiimid-, Amid-, Dichlorotriazin- oder Iminocarbonatstärken und deren Abbauprodukte eignen sich zur kovalenten Bindung von Pharmaka. Beschriebene Derivate anderer Polysaccharide bzw. deren Abbauprodukte, wie z. B. Dextran, Carrageen, Agar, Tragant, Gatti-Gummi, Karaya-Gummi, Guar-Gummi, Tara-Gummi, Alginate, Pektin oder Chitin, sind ebenfalls als reaktive Hüllpolymere einsetzbar. Genannte Derivate von Proteinen wie Casein, Kollagen oder Gelatine sowie deren Abbauprodukte sowie wasserlösliche physiologisch unbedenkliche synthetische Polymere, wie z. B. Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon oder Polyacrylsäuren erfüllen die erfindungsgemäßen Anforderungen ebenfalls.

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die genannten natürlichen und synthetischen Polymerderivate mit einem Molekulargewicht von 5000–250 000 Dalton, vorzugsweise 10 000–100 000 Dalton, zur Stabilisierung der magnetischen Partikel und Bindung von Pharmaka einzusetzen. Bei Polymeren dieser Größenordnung ist die Stabilität der magnetischen Partikel gegeben und der hydrodynamische Durchmesser des Gesamtvehikels wird nicht wesentlich erhöht.

Eine oder mehrere der genannten Stabilisatorsubstanzen werden der auf 70–90°C erwärmten wässrigen Lösung kolloidaler magnetischer Teilchen zugesetzt und 30 Minuten unter Rühren bei dieser Temperatur gehalten. Die gelösten Polymerderivate werden durch

## DE 196 24 426 A1

5

Chemisorption auf der Oberfläche der magnetischen Teilchen gebunden und bilden so eine reaktive Polymerhülle aus. Nach Abkühlen der so stabilisierten magnetischen Dispersion wird diese gegebenenfalls durch Ultraschall homogenisiert und nicht gebundene frei im Dispersionsmedium befindliche Hüllpolymere durch Ultrafiltration entfernt.

Erfindungsgemäß können beschriebene, die magnetischen Teilchen umhüllende Polymere mit bifunktionellen Reagentien bei geeigneter Temperatur und pH-Wert vernetzt werden. Als Vernetzungssubstanzen können z. B. Phosphoroxidchlorid, Natriummetaphosphat, Epichlorhydrin, Äthylen- oder Propylenoxid, Aldehyde, Dialdehyde, Vinylsulfon, Hexametyldiisocyanat oder Diethylentriaminpentaessigsäure-anhydrid zur Anwendung kommen.

Des weiteren können nachträglich auf deren Oberfläche neue oder zusätzliche ionenaustauscheraktive oder funktionelle Gruppen aufgebracht oder aktiviert werden. Hierfür werden bei geeigneten Reaktionsbedingungen die polymerumhüllten magnetischen Partikel z. B. mit Glycolsäurelacton Bernsteinsäureanhydrid, Chloressigsäure, Thionylchlorid, Carbodiimiden, Epoxiden, Chlortriazin, Bromcyan oder Perjodaten behandelt.

Die fertigen reaktiven magnetischen Dispersionen werden gegebenenfalls eingengt sowie durch Zugabe von Natriumchlorid oder Mannit isoton eingestellt, ampuliert und hitzesterilisiert.

Erfindungsgemäß kann die Bindung diagnostisch oder therapeutisch wirksamer Substanzen an die Hüllpolymere entweder über heteropolare Bindung durch Ionenaustausch oder durch eine kovalente Bindung erfolgen. Die ionische Bindung pharmakologischer Substanzen erfolgt über ionenaustauschaktive Gruppen, die sich auf der Oberfläche der Polymerhüllen befinden, wobei gebundene Ionen reversibel gegen Ionen der zu bindenden Substanz ausgetauscht werden. Bei anionenaustauscheraktiven Gruppen, wie z. B. primären oder sekundären Amino-, Imino- sowie tertiären Amino- oder quarteren Ammoniumgruppen werden bewegliche negativ geladene Ionen gegen andere Ionen ausgetauscht, umgekehrt verhält es sich bei kationenaustauschenden Gruppen, bei denen positiv geladene Ionen für diese Funktion zur Verfügung stehen.

In der Arzneiformenlehre sind diese Mechanismen bei den Oralien zur Retardierung von Wirkstoffen in sogenannten Resinaten (Arzneistoff-Ionenaustauscher-Präparate) eingeführt. Da viele Arzneistoffe kationischen Charakter aufweisen, so auch viele Zytostatika, soll exemplarisch die Ionenbindung von Doxorubicin an magnetischen Teilchen erläutert werden. Dieses als Hydrochlorid vorliegende Anthracyclin-Antibiotikum wird mit kationenaustauscheraktivem Stärkesulfonat beschichteten magnetischen Partikeln bei einem pH-Wert von 7,4 zusammengebracht, wobei die positiv geladenen NH-Gruppen des Aminosuckers an die negativen Sulfongruppen des Stärkederivats gebunden werden. In gleicher Weise reagieren auch die NH-Gruppen von Mitoxantron.

Anionenaustauscheraktive, mit Diethylaminoethylstärke beschichtete, magnetische Partikel können mit negativ geladenen Gruppen, z. B. an Oberflächen von Zellen wie cytotokininduzierten Killerzellen, eine Ionenbindung eingehen, wobei negativ geladene COO-Gruppen von den positiv geladenen Aminogruppen des Stärkederivats gebunden werden.

Ein besonderer Vorteil der heteropolaren Bindung pharmakologischer Substanzen auf der Oberfläche

6

polymerumhüllter magnetischer Teilchen liegt in der Tatsache begründet, daß es zu keiner substantiellen Veränderung der chemischen und somit pharmakologischen Struktur der zu transportierenden Agentien kommt. Der reversible Charakter der Bindung ermöglicht es zudem, die Desorption des gebundenen und transportierten Pharmakons von der Oberfläche der magnetischen Teilchen nach der maximalen Anreicherung im Zielgebiet einzustellen. Hierfür werden für das spezielle Pharmakon nach in vitro- und in vivo-Freisetzungsvorversuchen optimale Desorptionskonstanten durch Variation der Dissoziationsstärke der austauschaktiven Gruppen und der damit verbundenen Freisetzung durch Konkurrenzadsorption ermittelt. Durch Zugabe physiologisch verträglicher Puffer wie z. B. Phosphatpuffer können diese Mechanismen unterstützt werden.

Auf den Oberflächen der Hüllpolymere befinden sich freie reaktive Gruppen für die kovalente Bindung von Pharmaka. So kommt es zu einer chemischen Bindung zwischen reaktiven diazostärkeumhüllten magnetischen Teilchen mit Benzolringsystemen von z. B. Anthracyclin-Antibiotika. Mit Dialdehydstärke umhüllte magnetische Partikel binden das für die fibrinolytische Therapie bedeutsame Enzym Urokinase, wobei die reaktiven Aldehydgruppen eine chemische Bindung mit NH-haltigen Proteingruppen eingehen. Eine Entkopplung derartiger Bindungen erfolgt unter in vivo-Bedingungen durch enzymatische Zerlegung der polymeren Stabilisatorsubstanzen.

Erfindungsgemäß können auf der Oberfläche beschriebener polymerbeschichteter magnetischer Teilchen

- therapeutisch wirksame Substanzen wie Antibiotika, Antitumormittel, insbesondere Doxorubicin und Mitoxantron, Pflanzenalkaloide, Metallkomplexe, Antimetabolite, Lymphokine, Cytokine, Lymphotoxine, Gewebeplysamine oder Enzyme,
- gewebspezifische Bindungssubstanzen wie Antigene, Antikörper, Haptene, Ribonukleinsäure, Desoxyribonukleinsäure, Proteine, Hormone, oder Hormonanaloga,
- biologisch aktive Teilchen oder deren Komponenten wie Viren, Mikroben, Organellen, Algen, Pilze, Zellen, wie z. B. Lymphokin- oder Cytokin-induzierte Killerzellen

gebunden werden.

Erfindungsgemäß wird die vor Applikation mit dem zu transportierenden Pharmakon zusammengebrachte magnetische Dispersion nach einer Reaktionszeit von 15–30 Minuten z. B. intravenös verabreicht, wobei zeitgleich ein magnetisches Hochgradientenfeld im Bereich des Zielgebietes, wie Tumoren, entzündlichen Geweberegionen, Gefäßverschlüssen oder anderen pathologischen Gebieten angelegt wird. Hierfür eignen sich Hochenergie-Permanentmagnete, z. B. aus Neodymmaterialien, die als Arrays bzw. mittels Joch- und Rückschlußplatten, Blenden oder Sandwichkonfigurationen der Geometrie des Zielgebietes angepaßt sind und durch Magnetfeldmeßgeräte, z. B. Hallsonden, kontrolliert werden können.

Bei klinischen Untersuchungen am Menschen konnte mit Partikelgrößen von 200–500 nm ein optimaler Kompromiß zwischen erforderlicher intravasaler Verfügbarkeit und hoher magnetischer Sättigungsinduktion der Dispersion für den maximalen Eintrag in soliden Tumoren erzielt werden. So weisen wäßrige Suspension

## DE 196 24 426 A1

7

von 1 Gew.-% der erfindungsgemäßen magnetischen Partikel eine magnetische Sättigungsinduktion von 150 bis 250 Millitesla auf. Die Bluthalbwertszeit, also jener Zeitraum, in dem mindestens 50% der beladenen Partikel frei im Gefäßsystem zirkulieren, betrug 15–30 Minuten.

Inhomogene Magnetfelder mit Feldstärken von 0,5–1 Tesla ermöglichen, mit diesen Partikeln die Blutströmungskräfte zu überwinden und sie als Aggregate in den Tumorgefäßen zu fixieren. Die durch Konkurrenzreaktion bewirkte Freisetzung zytostatischer Substanzen wie Doxorubicin, Mitoxantron oder Cis-Platin wurde so eingestellt, daß diese sich 15–30 Minuten nach Ablauf der Bluthalbwertszeit vom magnetischen Träger lösen. Der freigesetzte niedermolekulare Wirkstoff diffundiert durch die Endothelwand der Tumorgefäße und kann dort seine zytotoxische Wirkung in Konzentrationen entfalten, die bei systemischen Applikationen nicht erreicht werden.

Ein Abdiffundieren des Pharmakons aus dem Zielgebiet wird durch den teilweisen oder vollständigen Gefäßverschluß mittels magnetischer Aggregate behindert. Nach lokaler Anreicherung im Tumor können beschriebene magnetische Partikel für die hochfrequenzfeldinduzierte Hyperthermie oder deren Kombination mit z. B. temperaturabhängigen Zytostatika verwendet werden.

Die Verteilung bzw. lokale Anreicherung der magnetischen Teilchen oder Partikel kann vorteilhaft durch NMR-Diagnostikverfahren überwacht und dokumentiert werden. Infolge magnetischer Feldinhomogenitäten haben bereits nanomolare Konzentrationen beschriebener magnetischer Partikel einen intensiven Einfluß auf das Signalverhalten bildgebener NMR-Sequenzen.

Erfindungsgemäß wird deshalb vorgeschlagen, die Teilchen oder Partikel als Kontrastmittel für die NMR-Diagnostik einzusetzen. Besonders die Bindung von Lenksubstanzen wie Antikörpern, Antigenen oder Hormonen würde sich zum Auffinden erkrankter Areale wie Myokardinfarkten, Tumoren oder Metastasen eignen.

Erfindungsgemäß können an die polymerumhüllten magnetischen Partikel radioaktive Isotope gekoppelt werden und durch lokale Anreicherung für diagnostische oder therapeutische Anwendungen, wie die lokale Strahlentherapie, die Neutroneneinfang-Therapie oder zur Erstellung von Szintigrammen genutzt werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Bindung von im Blut befindlichen toxischen Stoffen, Organismen oder Blutbestandteilen wie Schwermetallen, Toxinen, Viren, Bakterien oder Tumorzellen, die von den reaktiven magnetischen Teilchen gebunden und über magnetische Hochgradientenfelder abgeschieden werden können. Erfindungsgemäß kann man mittels der beschriebenen magnetischen Partikel in vitro z. B. Zellsorten, biologische Inhaltsstoffe oder DNA-Sequenzen für therapeutische oder diagnostische Zwecke isolieren.

Die Gewinnung oder der Austrag von Produkten, sowie die Magnetisierung von Bakterien, Pilzen oder Zellen im Bereich der Biotechnologie, der biologischen Abwasser- oder Luftreinigung kann mit den beschriebenen magnetischen Dispersionen verbessert oder ermöglicht werden.

An folgenden Beispielen soll die erfindungsgemäße Herstellung und Verwendung reaktiver magnetischer Partikel erläutert werden.

8

## Beispiel 1

20 g Eisen(III)-chlorid und 10 g Eisen(II)-chlorid werden in 200 ml Wasser gelöst und durch Zugabe einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung bei Temperaturen von 5–10°C neutralisiert. Bei der anschließenden 30-minütigen Erwärmung auf 90°C bilden sich unter CO<sub>2</sub>-Entwicklung aus dem Eisen(II)/(III)-carbonat Magnetitteilchen. Diese werden abfiltriert und mit destilliertem Wasser von Fremdionen gereinigt.

## Beispiel 2

40 g Eisen(III)-chlorid und 20 g Eisen(II)-chlorid werden in 200 ml Wasser gelöst und bei einer Temperatur von 70°C durch Zugabe einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert. Die unter CO<sub>2</sub>-Entwicklung gebildeten Magnetitteilchen werden nach Erhöhung der Temperatur auf 90°C nach 30 minütiger Dauer abgekühlt, filtriert und gereinigt.

## Beispiel 3

20 g Eisen(III)-chlorid und 10 g Eisen(II)-chlorid werden mit 40 g Citronensäure in 200 ml Wasser gelöst. Durch Zugabe von Ammoniak wird die Lösung neutralisiert und der entstandene Eisen(II)/(III)-citrat-Komplex durch Zugabe von Natronlauge bei einem pH-Wert von 11 in Magnetitpartikel umgewandelt und dieselben ausgefällt. Anschließend wird 30 Minuten auf 90°C erhitzt, mit Salzsäure neutralisiert und von Fremdionen gereinigt.

## Beispiel 4

20 g Eisen(III)-chlorid und 10 g Eisen(II)-chlorid werden in 400 ml Wasser gelöst. Basische Anionentauscherharze wie z. B. Amberlite IRA 420 werden bei Raumtemperatur in Anteilen und einer solchen Geschwindigkeit zugesetzt, daß ein konstanter Anstieg auf einen neutralen pH-Wert gegeben ist. Das Ionentauscherharz wird abdekandiert, die entstandenen Magnetitteilchen 30 Minuten auf 90°C erhitzt, abfiltriert und von Fremdionen gereinigt.

## Beispiel 5

500 ml einer 10 Gew.-%-igen wäßrigen Magnetitdispersion nach Beispiel 1–4 werden mit 10 ml einer 25 Gew.-%-igen Wasserstoffperoxidlösung versetzt und 30 Minuten bei 90°C oxidiert. Das entstandene  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> wird filtriert und gewaschen.

## Beispiel 6

10 g Arabinsäure werden in 500 ml einer auf 90°C erwärmten 10 Gew.-%-igen wäßrigen Magnetitdispersion gelöst und 30 Minuten unter Rühren bei dieser Temperatur gehalten. Nach der Homogenisierung mit Leistungsschall wird die entstandene stabilisierte magnetische Dispersion durch Ultrafiltration von überschüssigen nicht gebundenen Hüllpolymeren gereinigt.

## Beispiel 7

500 ml einer 10 Gew.-%-igen wäßrigen Magnetitdispersion nach Beispiel 1–5 werden auf 90°C erwärmt und 25 g Dicarboxylstärke darin gelöst. Unter Rühren

## DE 196 24 426 A1

9

wird diese Temperatur 30 Minuten gehalten, nach Abkühlen mit Ultraschall homogenisiert und von überschüssigen Polymeren gereinigt.

## Beispiel 8

25 g Dialdehyddextrin werden in 500 ml einer 10 Gew.-%-igen wäßrigen Magnetitdispersion nach Beispiel 1—4 unter Rühren bei einer Temperatur von 90°C gelöst. Nach 30 Minuten wird die stabilisierte Dispersion abgekühlt, mit Ultraschall homogenisiert und von überschüssigen Polymeren gereinigt.

## Beispiel 9

500 ml einer stabilisierten magnetischen Dispersion nach Beispiel 6—8 werden mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 11 angehoben, mit 100 ml Epichlorhydrin vermischt, unter Rühren bei Raumtemperatur 24 Stunden zur Reaktion gebracht und nach Beendigung des Vorganges gegen destilliertes Wasser dialysiert.

## Beispiel 10

500 ml einer stabilisierten magnetischen Dispersion nach Beispiel 6—8 werden nach Zugabe von Natronlauge auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt. Unter Rühren werden 100 ml einer 20 Gew.-%-igen Lösung von Diethylamino-ethylchloridhydrochlorid zugegeben, bei Raumtemperatur 4 Stunden unter Rühren zur Reaktion gebracht und anschließend dialysiert.

## Beispiel 11

Die in den Beispielen 6—10 beschriebenen stabilisierten reaktiven magnetischen Dispersionen werden unter sterilen Bedingungen durch Zugabe von Mannit oder Natriumchlorid blutisoton eingestellt, ampulliert und hitzesterilisiert.

## Beispiel 12

50 mg Doxorubicin werden in 10 ml einer 1 Gew.-%-igen magnetischen Dispersion nach Beispiel 11 gelöst und mit 30 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Bindung des Doxorubicins an die magnetischen Partikel erfolgt hierbei über die bekannte Ionenaustauscherreaktion, wobei sich die positiv geladenen NH-Gruppen des Aminozuckers von Doxorubicin mit den endständigen Glucuronsäure-Gruppen der Arabinsäure verbinden.

## Beispiel 13

50 mg Mitoxantron werden in 10 ml einer 1 Gew.-%-igen magnetischen Dispersion nach Beispiel 11 gelöst und mit 30 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Bindung des Mitoxantrons an die magnetischen Partikel erfolgt hierbei über die bekannte Ionenaustauscherreaktion, wobei sich die positiv geladenen NH-Gruppen von Mitoxantron mit den endständigen Glucuronsäure-Gruppen der Arabinsäure verbinden.

## Beispiel 14

200 Einheiten des fibrinolytisch wirksamen Enzyms Urokinase werden mit einer 1 Gew.-%-igen magne-

10

tischen Dispersion nach Beispiel 8 vermischt und mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Reaktive Aldehydgruppen des Hüllpolymeren reagieren unter Ausbildung einer chemischen Bindung mit NH-haltigen Proteingruppen des Enzyms.

## Beispiel 15

Die in den Beispielen 12—14 beschriebenen arzneistoffbeladenen magnetischen Dispersionen werden intravenös appliziert, zeitgleich wird ein inhomogenes Magnetfeld im Bereich des Zielgebietes aufgebaut und zur Gewährleistung einer maximalen Anreicherung bis zu 30 Minuten nach der bekannten intravasalen Verfügbarkeit aufrechterhalten.

## Abbildungen

Fig. 1 Bindungskapazität von Doxorubicin an beschriebener magnetischer Dispersion

Fig. 2 Desorption von Doxorubicin unter physiologischen Bedingungen (37°C, 290 mmol/l, pH 7,4), Zunahme der Fluoreszenzaktivität (in arbiträren Einheiten) als Funktion der Zeit.

Fig. 3 Desorptionsverhalten von Doxorubicin in vivo (Ratte).

Fig. 4 Prozentuale Verfüllbarkeit einer Venole der Ratte nach Gabe der magnetischen Dispersion zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation als Hinweis für die intravasale Verfügbarkeit der magnetischen Partikel in vivo.

Fig. 5a und b Lokale Anreicherung magnetischer Partikel am menschlichen Schädel in einem Plattenepithelkarzinom im HNO-Bereich durch Auslöschungsphänomene T2-gewichteter Sequenzen im Vergleich zur Aufgangsaufnahme.

## Patentansprüche

## 1. Magnetische Partikel, umfassend

- a) einen Kern, enthaltend nanokristalline magnetische Teilchen aus  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , Doppeloxiden oder -hydroxiden des zwei- oder dreiwertigen Eisens mit zwei- oder dreiwertigen Metallen oder Gemische der genannten Oxide oder Hydroxide und
- b) eine Hülle, bestehend aus einem Polymeren mit reaktiven Gruppen, die zur kovalenten Bindung oder zum Ionenaustausch befähigt sind.

2. Magnetische Partikel nach Anspruch 1, bei denen die nanokristallinen magnetischen Teilchen als Eindomänenteilchen vorliegen.

3. Magnetische Partikel nach Anspruch 1 oder 2, bei denen die nanokristallinen magnetischen Teilchen als Eindomänenteilchen vorliegen und in Form von magnetischen Mehrdomänenteilchen, die eine hohe Packungsdichte von Eindomänenteilchen aufweisen, angeordnet sind.

4. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei denen die nanokristallinen magnetischen Teilchen einen Durchmesser von 3 bis 10 nm aufweisen.

5. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, die einen Durchmesser von 200 bis 500 nm aufweisen.

6. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei denen das Polymere ein zahlengemittel-

## DE 196 24 426 A1

11

- tes Molekulargewicht von 5000 bis 250 000 aufweist.
7. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei denen die Hülle aus einem Polysaccharid oder Polysaccharid-Derivat besteht. 5
8. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei denen die Hülle aus einem vernetzten Polymeren besteht.
9. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei denen die Hülle aus einem durch Reaktion mit Epichlorhydrin oder Diethylamino-ethylchloridhydrochlorid vernetzten Polymeren besteht. 10
10. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei denen das Hüllpolymere freie Säuregruppen, ausgewählt aus Carbonsäure-, Sulfonsäure-, Schwefelsäure-, Phosphonsäure- oder Phosphorsäure-Gruppen, aufweist. 15
11. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 10, bei denen das Polymere aus Arabinsäure oder Dicarboxylstärke besteht. 20
12. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, bei denen das Polymere Diethylamino-ethyl-Gruppen aufweist.
13. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 12, umfassend weiterhin eine therapeutisch wirksame Substanz. 25
14. Magnetische Partikel nach Anspruch 13, bei denen die therapeutisch wirksame Substanz Urokinase ist.
15. Magnetische Partikel nach Anspruch 13, bei denen die therapeutisch wirksame Substanz ein Antitumormittel ist. 30
16. Magnetische Partikel nach Anspruch 13, bei denen die therapeutisch wirksame Substanz Doxorubicin, Mitoxantron oder Cisplatin ist. 35
17. Magnetische Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 16, die einen Durchmesser von 200 bis 500 nm aufweisen.
18. Wäßrige Suspension von magnetischen Partikeln nach einem der Ansprüche 1 bis 17. 40
19. Wäßrige Suspension nach Anspruch 18, die 1 Gew.-% der magnetischen Partikel enthält und eine magnetische Sättigungsinduktion von 150 bis 250 Millitesla aufweist.
20. Arzneimittel, enthaltend eine wäßrige Suspension nach Anspruch 18 oder 19 zusammen mit üblichen Hilfsstoffen. 45
21. Verwendung einer wäßrigen Suspension nach Anspruch 18 oder 19 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Tumorthherapie. 50
22. Verfahren zur Herstellung nanokristalliner magnetischer Teilchen aus  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  oder Doppeloxiden oder -hydroxiden des zwei- oder dreiwertigen Eisens, bei dem eine Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-Salzlösung in eine Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-carbonat-Lösung überführt wird und anschließend thermisch oder chemisch oxidiert wird. 55
23. Verfahren zur Herstellung nanokristalliner magnetischer Teilchen aus  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  oder Doppeloxiden oder -hydroxiden des zwei- oder dreiwertigen Eisens, bei dem eine Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-Salzlösung mit Komplexbildnern komplexiert wird und anschließend eine alkalische Ausfällung durchgeführt wird. 60
24. Verfahren nach Anspruch 23, bei dem Ethylen-diamin-tetraessigsäure, Citronensäure oder Weinsäure als Komplexbildner verwendet wird. 65
25. Verfahren zur Herstellung nanokristalliner ma-

12

gnetischer Teilchen aus  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  oder Doppeloxiden oder -hydroxiden des zwei- oder dreiwertigen Eisens, bei dem einer Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-Salzlösung basische Anionenaustauscher-Harze zugegeben werden.

26. Verfahren zur Herstellung nanokristalliner magnetischer Teilchen aus  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , Doppeloxiden oder -hydroxiden des zwei- oder dreiwertigen Eisens mit zwei- oder dreiwertigen Metallen oder Gemischen der genannten Oxide oder Hydroxide, bei dem eine Lösung von Salzen des zwei- oder dreiwertigen Eisens und zwei- oder dreiwertigen Metallen nach einem der Ansprüche 22 bis 25 umgesetzt wird.

---

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

---



- Leerseite -

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer:

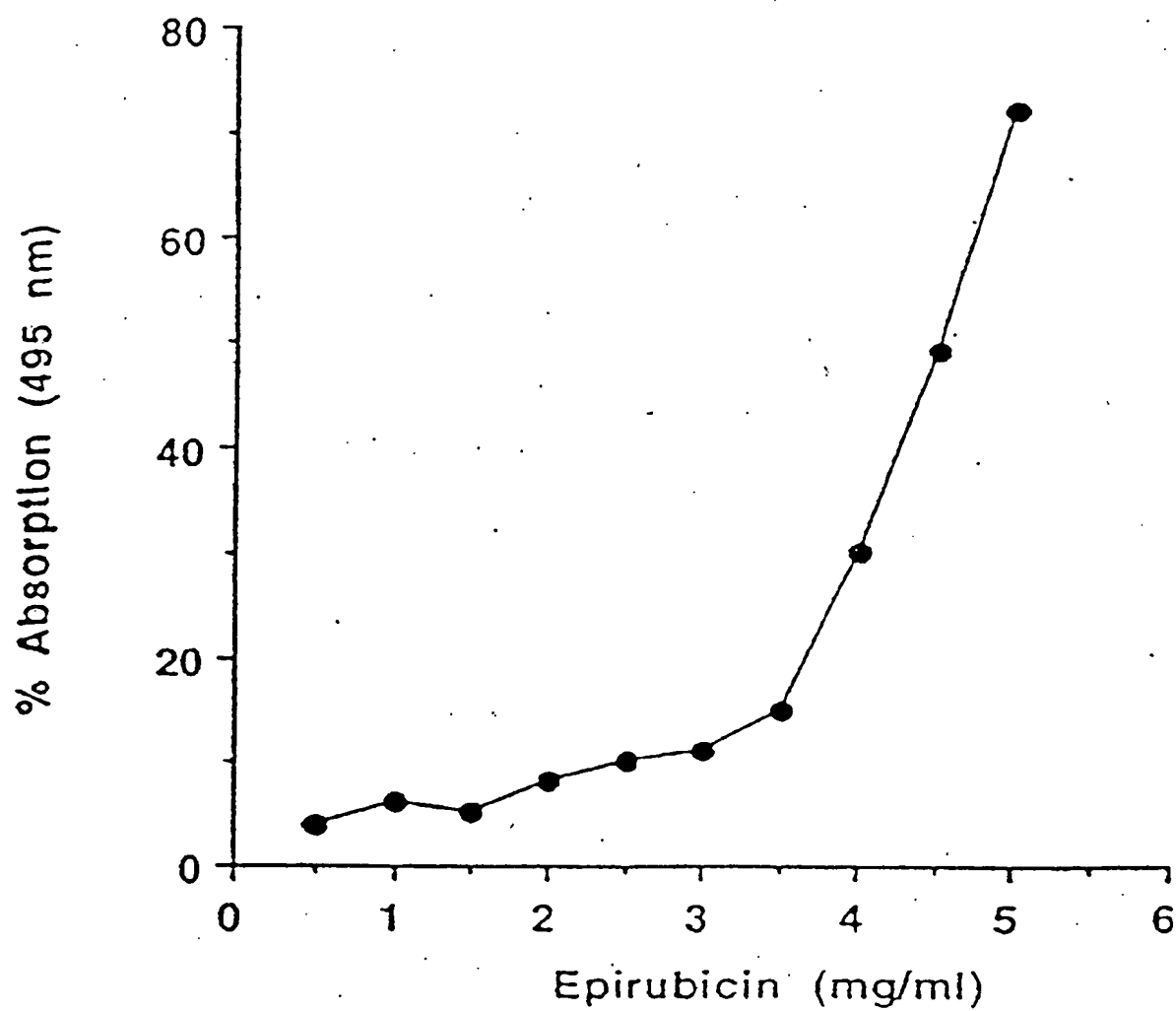
DE 196 24 426 A1

Int. Cl.<sup>6</sup>:

H 01 F 1/09

Offenlegungstag:

2. Januar 1998



Figur 1

ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:

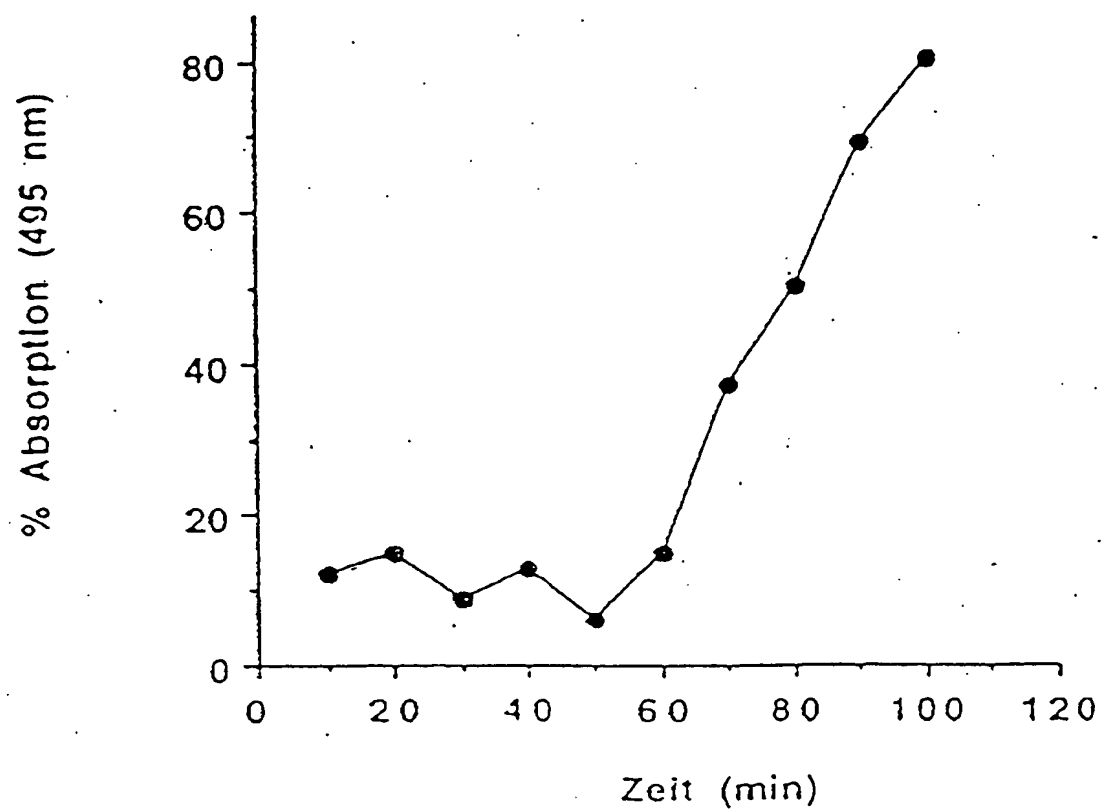
DE 196 24 426 A1

Int. Cl.<sup>6</sup>:

H 01 F 1/09

Offenlegungstag:

2. Januar 1998

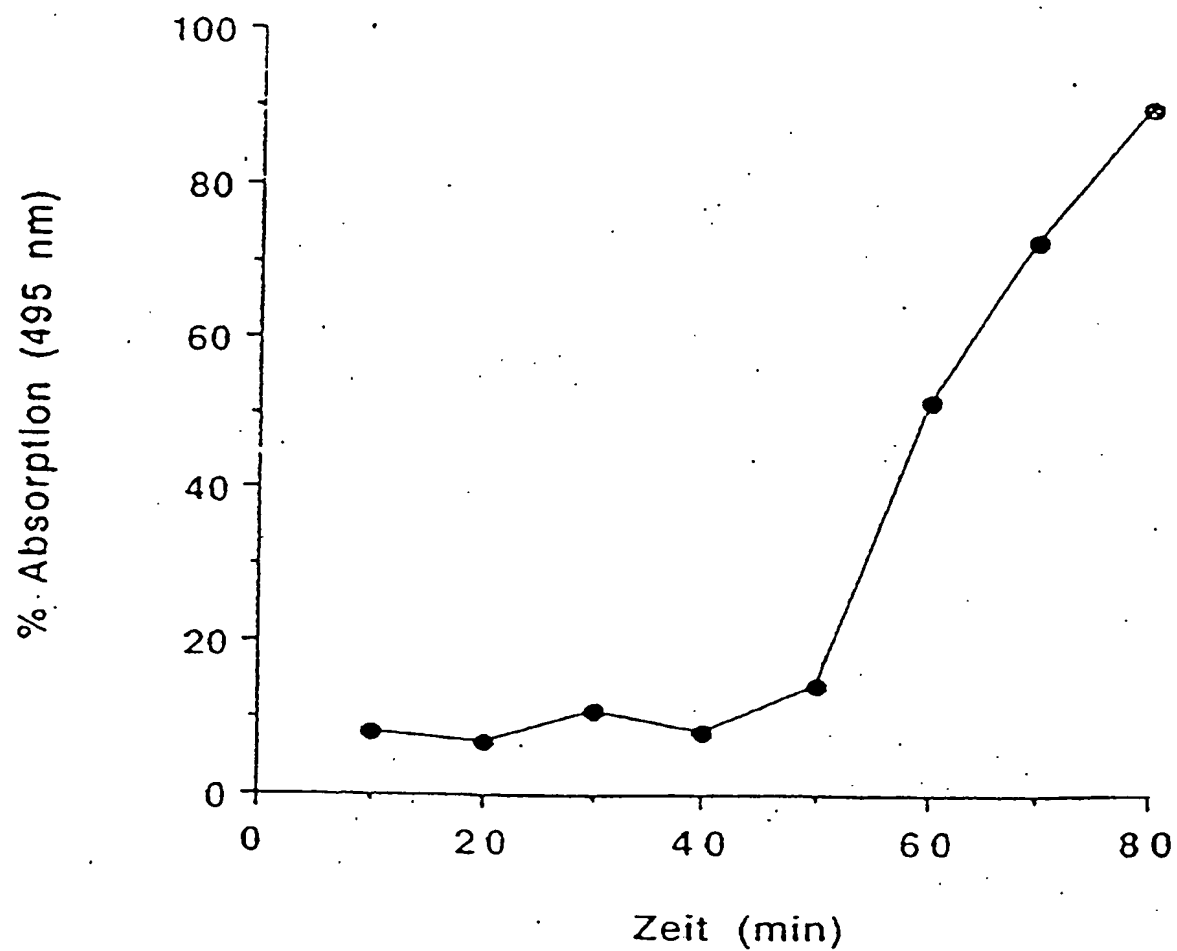


Figur 2

ZEICHNUNGEN SEITE 3

Nummer:  
Int. Cl.<sup>8</sup>:  
Offenlegungstag:

DE 196 24 426 A1  
H 01 F 1/09  
2. Januar 1998

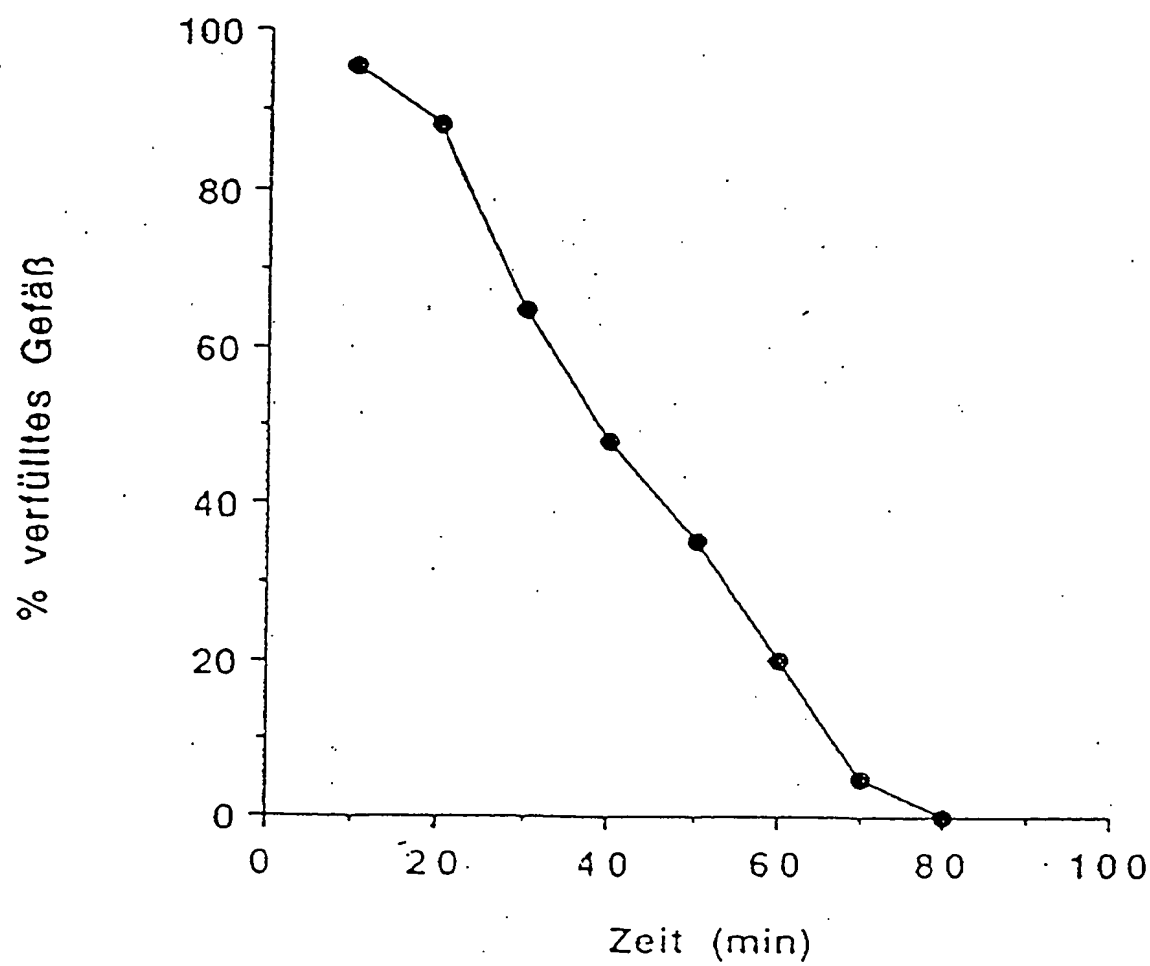


Figur 3

ZEICHNUNGEN SEITE 4

Nummer:  
Int. Cl.<sup>8</sup>:  
Offenlegungstag:

DE 196 24 426 A1  
H 01 F 1/09  
2. Januar 1998



Figur 4

ZEICHNUNGEN SEITE 5

Nummer:

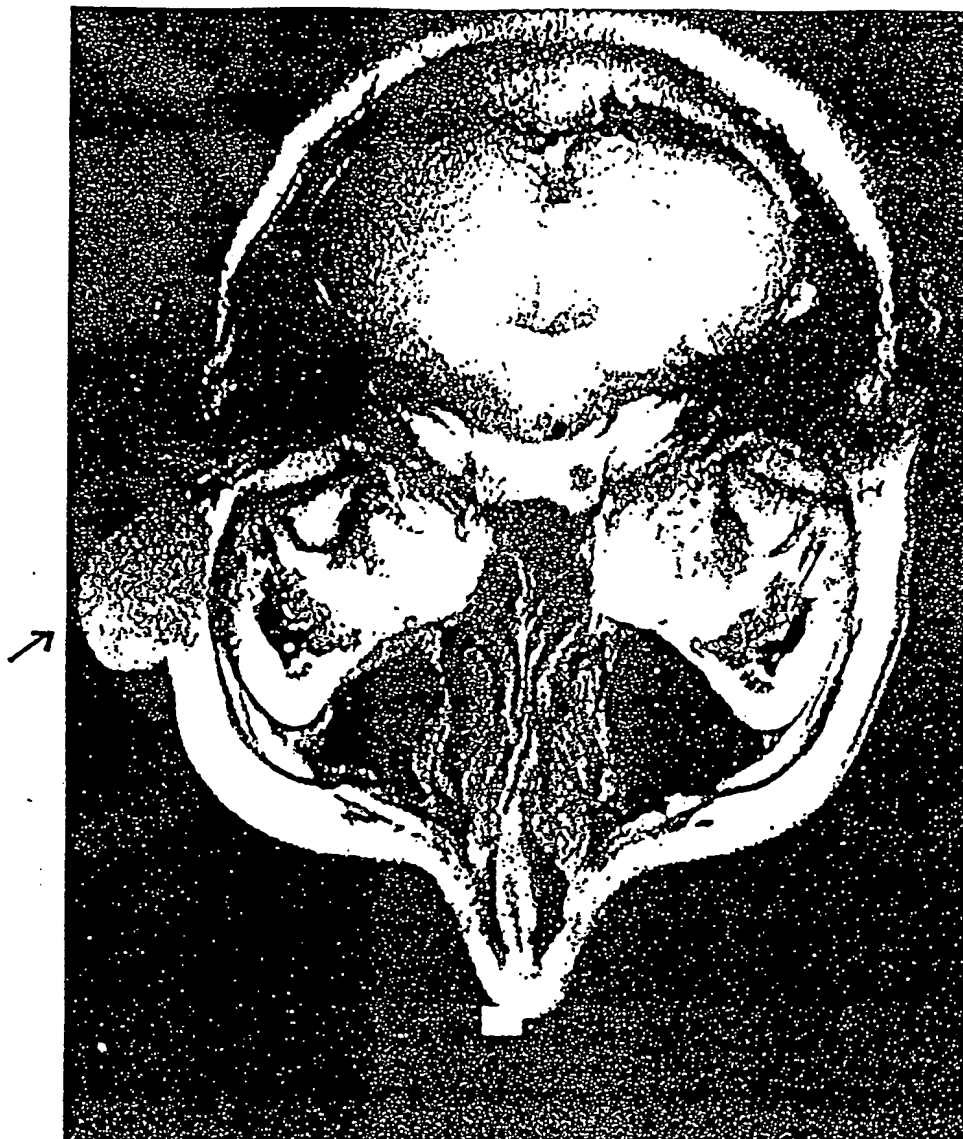
DE 196 24 426 A1

Int. Cl.<sup>6</sup>:

H 01 F 1/09

Offenlegungstag:

2. Januar 1998



Figur 5a

702 061/128

ZEICHNUNGEN SEITE 6

Nummer:

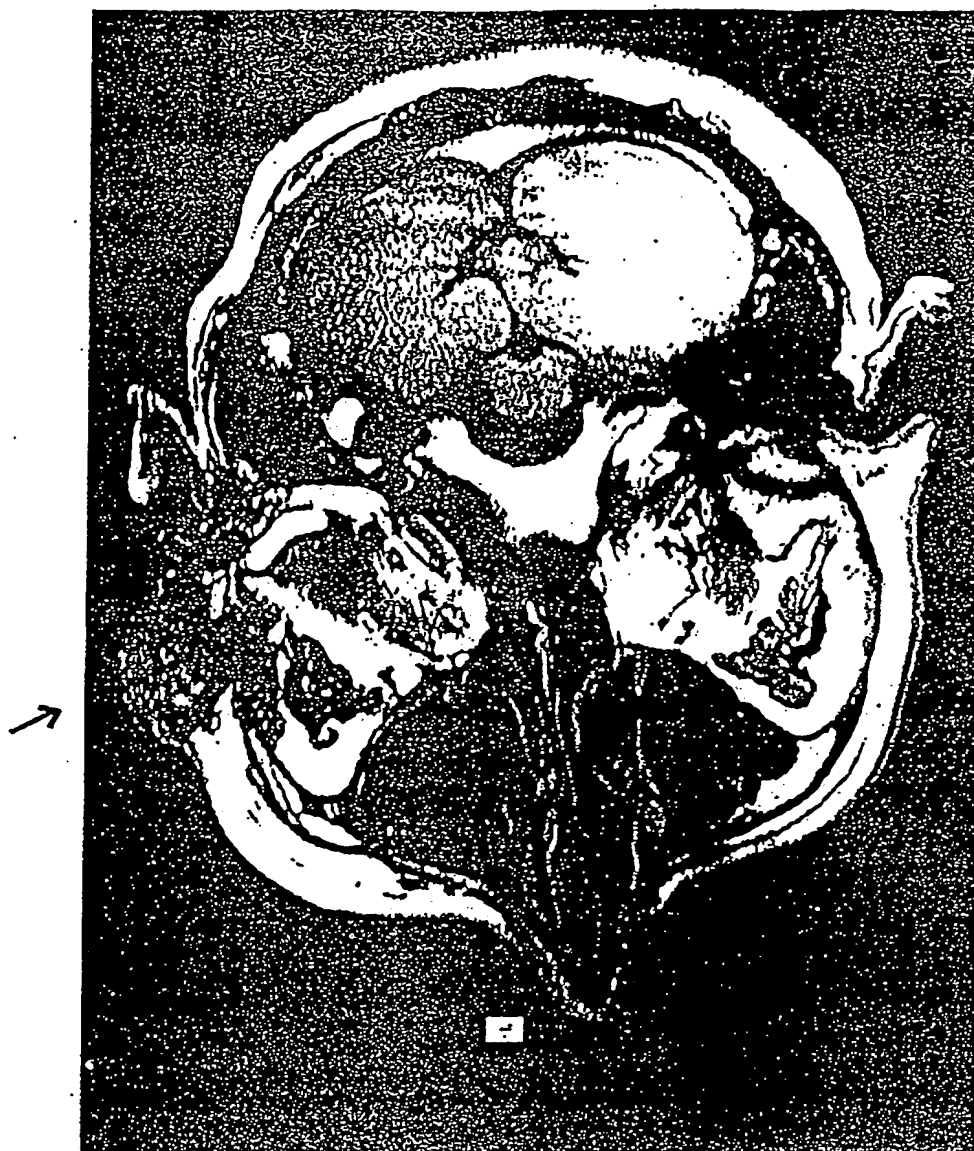
DE 196 24 426 A1

Int. Cl.<sup>6</sup>:

H 01 F 1/09

Offenlegungstag:

2. Januar 1998



Figur 5b

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**